◈ 원 저 ◈

신생 뼈의 재생에 관한 마우스 두개골 결손모델 시 마이크로 시티의 정량적 분석법

정홍문
대구보건대학교 방사선과

Quantitative Analysis of μ-CT about Neo-Bone Regeneration on Mouse Calvarial Defected Model

Hong-moon Jung
Department of Radiological Science, Daegu Health College

Abstract

Bone is so crucial anatomy for human body. Many researchers study deep into a subject about bone regeneration. There is no standard analysis for quantitative Neo-bone regeneration on calvarial defected model. Micro CT is so useful method to quantitative analysis of Neo-bone regeneration. This study was show that how to quantitative analysis of Neo-bone regeneration with μ-CT. Micro CT was possible to quantitative analysis for Neo-bone regeneration on Calvarial defected model. futhermore Not only was Micro CT possible for qualitative analysis but quantitative analysis on the mouse calvarial model. This study will provide bone biology researchers with accurate quantitative analysis.

Keyword: Bone regeneration quantitative analyze, Micro computed tomography ,Mouse calvarial defected model, neo-bone regeneration quantitative Micro CT

Received: April 26. 2013. 1st Revised: May 3. 2013. / 2nd Revised: May 10. 2013./ Accepted for Publication: May 20. 2013.
Corresponding Author: 정홍문
CP: 010-2024-0564
E-mail: redmoon74@dhc.ac.kr

Ⅰ. Introduction

인체의 조직에 있어서 근간이 되는 조직은 뼈이다. 뼈의 구조는 뼈의 중심부에 조직인 해면골(trabecular bone) 과 뼈의 외부를 이루고 있는치밀골(Cortical bon) 등으로 구분 될 수 있다.[1)]

뼈는 항상 만들어 지고 또한 항상 흡수된다. 뼈에 관한 항상성(Homeostasis)은 여러 가지 뼈 질환의 중요한 열쇠가 된다. 뼈를 구성하는 다양한 성분중에 뼈는 칼슘(Ca)과 다양한 미네랄로 구성되어 있으며 미네랄의 성분은 Hydroxy apatite 라 불리는 성분이 대부분의 뼈의 성분을 이룬다. 뼈가 형성되어짐은 뼈의 조골세포인 osteoblast 라는 세포의 분화가 이루어지고 이것을 가교하여 촉진 시켜질수 있는 Osteocyte 라는 세포가 존재하여 뼈를의 분화를 촉진시킨다.[2)3)] 분화되어진 조골세포는 알카라인을 활성화 시킴으로 해서 (alkaline phosphate)를 촉진시켜 미네랄을 형성하며 이로인한 세포내의 칼슘 수용체 체널을 (Calmodulin) 촉진시켜 ECM(external cellular matrix) 상의 콜라겐 요소 1(type 1 collagen)과 상호작용으로 누적이 일어나 뼈의 기본 조직이 형성된다.[4)5)]

다양한 뼈의 형성기전은 세포의 다양한 수용체들로 인해 형성이 된다. 외부 충격에 의한 사고나 뼈의 장해로 인한 손실로 인해 다양한 뼈이식이 이루어지고 있다. 자기 뼈 이식(autogenous) 과 같은 방법이 가장 적절하지만, 이것이 여유치가 않으면 시체에서 가져온 뼈를 이식하기도 한다. 하지만 이두가지 방법보다는 환자 스스로 뼈의 손상부위에 대체물질 지지체를 삽입하여 뼈의 재생을 유도하게 된다. 때문에 이러한 scaffold라 불리는 지지체의 선택은 뼈 재생에 관해 중요한 선택인자로 작용하게 된다. Poly-lactic-acid 와 같은 합성 고분자를 이용하여 지지체를 만들기도 하며 콜라젠(collagen) 이나 피브린(fibrin) 과같은 생체 재료를 선택하기도 한다.[6)7)]

마우스를 이용한 두개골 결손모델(Mouse calvaria defected model) 은 이러한 지지체의 효과를 분석하기 좋은 모델로 알려져 있다.[8)]

뼈의 재생효과를 분석하는 방법에는 다양한 방법이 있지만 그중에서도 대표적으로 사용되는 방법이 X-ray 이 선원을 이용한 마이크로 시티(Micro-computed tomography) 가 주를 이루고 있다. 하지만 이 분석법에는 어떠한 재생에 관한 상대적 수치에 의한 정성적인 상태를 확인 할 수 있다. 하지만 이번 논문에서는 마이크로 시티를 이용한 정량적인 분석의 기준점을 제시하고자 실험을 하였다. 원형인 결손부위를 정성적인 재생 이미지를 떠나서 보다 정량적인 체적을 좀더 정확하게 계산할수 있는 방법을 제시함으로써 비교하고자 하는 마우스 두개골 결손 모델에서의 뼈 재생 지지체의 효과를 분석하여 뼈의 재생 연구자로 하여금 정확한 뼈 재생량의 정보에 도움을 주고자 한다.

Ⅱ. Materials and methods

1. 동물 실험 (마우스 두개골 결손 모델)

실험용 마우스 (Black Mouse CD57 8주령)을 이용하여 마우스 두개골 결손모델을 구현하였다. 졸레틸(Zoletil 0.006cc/10g) 과 Rompun (0.004cc/10g)을 이용하여 마취를 실시한 후 핸드피어스를 이용하여 지름 4mm의 원형 톱날로 마우스 두정부위에 결손을 가하였다. 결손을 가한 후 4주후 CO_2 가스로 희생한후 뼈의 손실에 관한 자가 재생력을 측정하였다. 따라서 결손을 하지 않은 다른 부위와 비교하여 뼈가 얼마나 재생이 되었는가를 분석하였다.

2. 마이크로 시티 제원 및 촬영조건

마이크로 시티는 스카이 스캔과 스카이 스캔 프로그램을(skyscan CT An 과 3D CT Vol ; Belgium)을 사용하였다. 해상력은 1장당 17.9μm 절편으로 Section 되었으며, 픽셀 크기는 2.5μm 이고 촬영조건은 0kV, 200μA, 15minute 회전각도는 rotation angle 180도를 유지하여 촬영하였다.

3. 마이크로 시티 분석방법

마우스 두개골 결손모델에서 마우스 한 마리 상에 정중앙 라인을 기준으로 오른쪽은 미 결손부위(Non-defected site 4mmΦ)는, 두께 (Thick) 1.5mm로 마이크로 시티에 측정된다. 이때 원형 체적(Cylinder volume)인 $\pi r^2 h$ 를 이용하면 결손하지 않은 뼈의 총량은 18.8mm^3 체적 결과가 나온다. 이는 원래의 마우스 두개골의 뼈의 정량에 해당한다. 또한 18.8mm^{3}의 마이크로 시티상의 Pixel^{3}값은 392688 Pixel3 값에 해당한다. 각각의 18.8mm^3,392688 Pixel^{3}결과를 100%의 원

래 뼈의 량으로 놓고 반대쪽 부위에 결손 부위(defected site 4mmΦ)에 재생되어진 결과의 Pixel^{3}값을 구하여 비례식으로 구하였다.

4. 통계적 분석

모든 통계적 수치의 차이는 엑셀을 통하T-student (t-test) 를 통하여 검증되었으며 P 값 value 0.05〈P의 범위에 있을 때 통계적 차이가 유의한 것으로 간주하였다.

Ⅲ. 결과

마이크로 시티촬영후 촬영된 파일을 스카이 스캔 이미지 분석프로그램인 CT An를 이용하여 불러 온다. 한 장의 이미지만 클릭하면 자동적으로 누적된 모든 파일의 정보를 볼 수 있다.

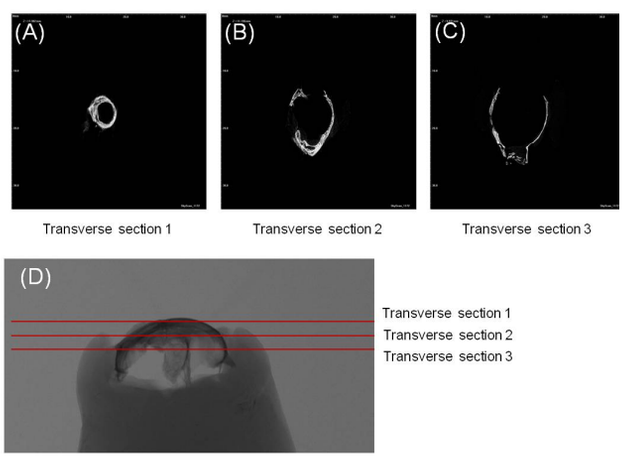


Fig. 1. Mouse calvarial micro CT prescanning image and transverse section image
Each of Transverse section image (A) Mouse calvarial top, (B) Mouse calvarial Middle ,(c) Mouse calvarial bottom, and (D) Micro ct pre scanning image. These image show information of mouse calvarial defect position.

마이크로 시티가 주는 정보는 횡단면상인(transverse) 한 이미지로 구성되어 있으며 이는 누적에 따른 마우스 두개골의 위치 정보를 파악할 수 있다. Fig1. 이것을 이용함으로서 마우스 두개골 뼈의 두께를 가늠하게 된다.

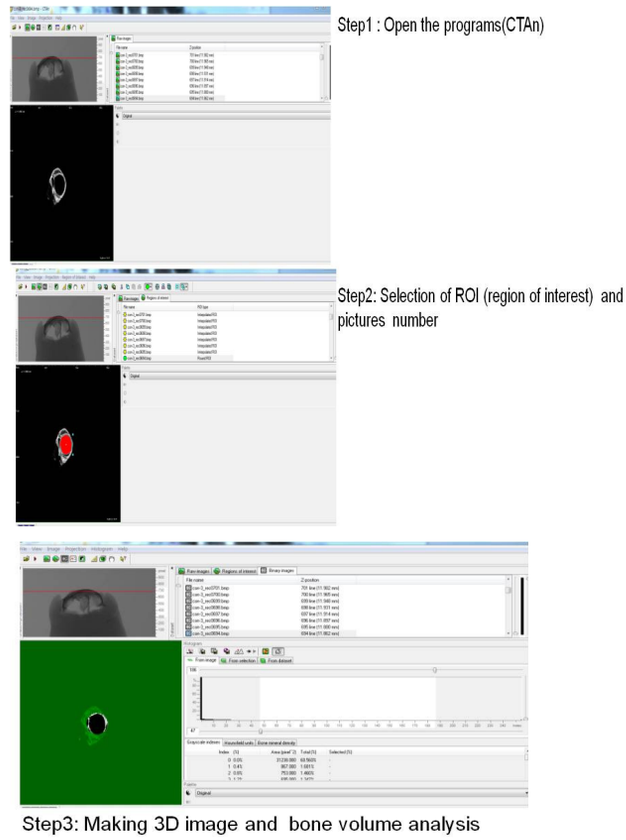
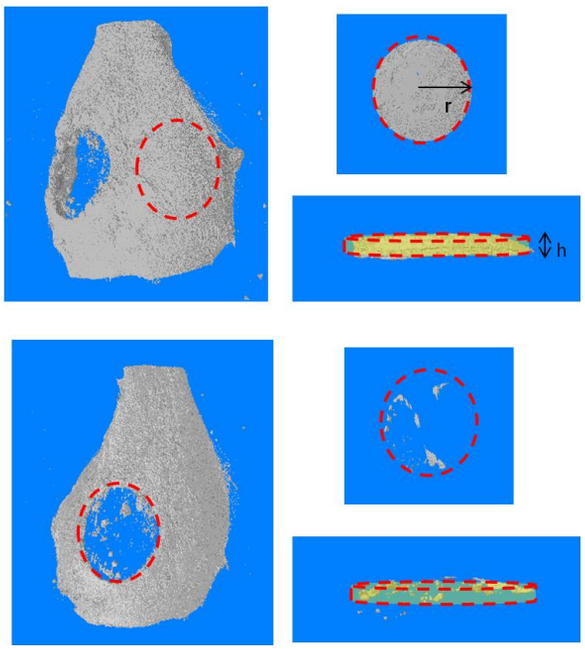


Fig. 2. Step of micro CT analysis programs skyscan

위치 정보의 확인이 끝난후에 마우스 두개골의 두께를 생각하여 충분한 누적 이미지를 선택한후에 이번에는 대표적인 한 사진을 선택하여 ROI(Region of interest)를 선택 한다. 결손모양이 4mm의 원형이므로 정확한 4mm의 원형을 선택한후에 원형 ROI를 잡아야 한다. 그래야만 원형내부에 있는 뼈를 정량화 할수 있게 된다.



Non defected site 4mmΦ
Thick 1.5mm
Cylinder volume = $\pi r^2 h$ ---------- original BV
18.8mm^3
Bone volume,BV,392688.Pixel^3 ------ Programs BV

18.8mm^3=100%=392688.Pixel^3 ------ ** ①

Defected site 4mmΦ ---------- removing site BV
Thick 1.5mm
18.8mm^3

RegenerationBV,27932.Pixel^3 ------ Programs BV

Original BV,Pixel^3 : Regeneration BV,Pixel^3=100 % : X

Regeneration BV percent ,X=7.2%

18.8mm^3: 100%=X: 7.2%

X=1.35mm^3

Fig3. Calculation of regeneration bone volume in mouse calvarial defected model

Step① measuring and calculation original bone volume(consensus numerical value).

Step② easuring of micro CT pixel value in defected area.

Step③ inal calculation of bone regeneration volume.

비교하고자 하는 파일을 동일한 방법으로 불러오기를 실행후에(step4), 동일크기에 4mm의 원형 ROI를 잡는다.(step5) 얻어진 숫자로 통계적 처리를 한다. figure2.

ROI를 설정후 3D and analysis를 클릭하면 수분내에 입체영상이 만들어진다. 다양한 입체영상을 CT vol 이라는 스카이 스캔에서 제공하는 프로그램을 사용하여 만들 수 있다. Fig3 의 위쪽그림에서 마우스에 결손부위를 가한 왼쪽부위와 결손을 하지 않은 오른쪽 부위의 각각 마이크로 시티화 하여 만든 이미지도 볼 수 있다. Fig3 결손을 가한부위에 원형이 완전하게 재생이 되었다면 오른쪽과 같은 체적수치를 나타 낼것이고 만약에 재생량이 적다면 결손을 가한부위가 더 작은 체적 수치를 나타낼 것이다. (실험 결과 비교방법은 실험방법에 서술하였음) 자세한 단계는 step 1,2,3으로 표현하였다. 이것을 토대로 그래프를 도식화 하면 fig. 4와 같다.

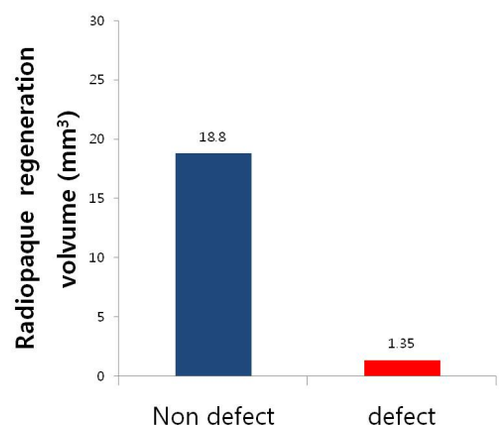


Fig. 4. Diagram data of calculation of regeneration bone volume in mouse calvarial defected model

결손을 가한 마우스 두개골 왼쪽 부위의 재생량은 1.35mm^3 으로 재생량이 분석이 되었고 자가 뼈 재생 다음과 같다. 결손부위를 가하지 않은 마우스 두개골 오른쪽 부위를 100%의 재생으로 간주하였을 때 약7.2% 만큼 재생이 된 것을 알수 있었으며, 또한 정확한 체적량으로 계산하면 전체 마우스 두개골 오른쪽 뼈의 량은 18.8mm^{3}이며 이에 반해 18.8mm^3 량을 제거한후 다시 자가 재생이 일어난 뼈의 량은 1.35mm^{3}에 해당된다. 이러한 비례식을 이용하여 수치화 한다면 마이크로 시티를 이용한 정량적인 분석방법이 가능해 진다.

Ⅳ. Discussion

마우스 두개골 결손모델(Mouse calvaria defected Model) 은 뼈 재생 연구자들에게 대표적인 모델로 알려져 있다.[9)10)] 체내(Invivo) 실험의 대표적인 결손모델로서 뼈 재생에 관한 지지체 효과나 각종 약물효과를 볼 때 사용된다. 마우스를 희생후에 우리가 얻을수 있는 정보는 다양한 방법으로 분석이되지만 그중에서도 마이크로 시티의 분석은 정성적인 분석과 정량적인 분석을 제공하여 준다.[11)12)] 이번 연구에서는 마우스두개골을 파괴한후 정상적으로 파괴되지 않은 부위의 뼈의 량과 이와 비교하여, 파괴한 부위의 량을 비교 해냄으로써 정확한 뼈의 재생량을 정량화 하는데 중점을 두었다. 하지만 몇가지 간과 해서는 안될 것 이 있다. 이는 시술자의 따라 약간에 차이를 가질 수 있으며 각종 마이크로 시티를 만드는 회사마다 프로그램이 공유가 되지 않고 각자의 회사의 형식에 맞게 바꾸어 짐으로써 마이크로 시티 제조 및 프로그램 회사마다 차이점을 가져다 줄 수 있다. 또한 수작업으로 이루어지는 이 단계별 관심지역 설정(ROI)는 시술자마다 약간의 차이를 가져 올수 있다. 하지만 비교하고자 하는 두종류의 지지체 라던가 약물의 효과에서는 상대적으로 나타낼수 있기 때문에 정확하게 적용 될 수 있다.

Ⅴ. Conclusion

마우스 두개골 결손 모델을 이용하여 다양한 지체의 효과 분석이 이루어진다. 이번 연구에서 제시한 상대비례식을 적용하여 마이크로 시티를 적용하여 결과를 도출해낸다면 정성적인 이미지 그림뿐만 아니라 정량적이 신생 뼈의 량을 정확히 분석 할 수 있게된다. 이러한 방법은 마우스 두개골 결손 모델을 사용하여 마이크로 시티를 적용하여 정량적 재생 뼈의 량을 분석하고자 하는 연구자들에게 많은 도움을 줄 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Yang J, Park OJ, Lee YJ, Jung HM, Woo KM, Choi Y. The 4-1BB ligand and 4-1BB expressed on osteoclast precursors enhance RANKL-induced osteoclastogenesis via bi-directional signaling. Eur J Immunol. 2008 Jun;38(6):1598-609.
2. Seeman E. Bone modeling and remodeling. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2009;19(3):219-33. Review.
3. Amizuka N, Ubaidus S, de Freitas PH, Sultana S, Li M. [Ultrastructure and biological function of osteocytes]. Nihon Rinsho. 2009 May;67(5):868-71. Review.
4. Rowland CR, Lennon DP, Caplan AI, Guilak F. The effects of crosslinking of scaffolds engineered from cartilage ECM on the chondrogenic differentiation of MSCs. Biomaterials. 2013 May 2. 9612(13)00471-7.
5. Jabbari E. Osteogenic peptides in bone regeneration. Curr Pharm Des. 2013;19(19):3391-402.
6. Shainer R, Gaberman E, Levdansky L, Gorodetsky R. Efficient isolation and chondrogenic differentiation of adult mesenchymal stem cells with fibrin microbeads and micronized collagen sponges. Regen Med. 2010 Mar;5(2):255-65.
7. Kim BS, Kim JS, Lee J. Improvements of osteoblast adhesion, proliferation, and differentiation in vitro via fibrin network formation in collagen sponge scaffold. J Biomed Mater Res A. 2013 Feb 15. doi: 10.1002/jbm.a.34567.
8. Clafshenkel WP, Rutkowski JL, Palchesko RN, Romeo JD, McGowan KA, Gawalt ES, et al. A novel calcium aluminate-melatonin scaffold enhances bone regeneration within a calvarial defect. J Pineal Res. 2012 Sep;53(2):206-18.
9. Behr B, Sorkin M, Lehnhardt M, Renda A, Longaker MT, Quarto N A comparative analysis of the osteogenic effects of BMP-2, FGF-2, and VEGFA in a calvarial defect model. Tissue Eng Part A. 2012 May;18(9-10):1079-86.
10. Koob S, Torio-Padron N, Stark GB, Hannig C, Stankovic Z, Finkenzeller G. Bone formation and neovascularization mediated by

mesenchymal stem cells and endothelial cells in critical-sized calvarial defects. Tissue Eng Part A. 2011 Feb;17(3-4):311-21.

11. Kang H, Sung J, Jung HM, Woo KM, Hong SD, Roh S. Insulin-like growth factor 2 promotes osteogenic cell differentiation in the parthenogenetic murine embryonic stem cells. Tissue Eng Part A. 2012 Feb;18(3-4):331-41.

12. Zhang Y, Wu C, Friis T, Xiao Y. The osteogenic properties of CaP/silk composite scaffolds.Biomaterials. 2010 Apr;31(10):2848-56.